

**CRP:** Livestock

**Flagship:** FP3 – Feeds and Forages

**Cluster:** 3.2

**Activity:** Report on phenotyping of two biparental populations (156 individuals) to identify QTLs associated with spittlebug resistance

**Deliverable:** 24590

## **Informe sobre el fenotipado de dos poblaciones biparentales (156 individuos) para identificar los QTL asociados con la resistencia al salivazo**

*Report on phenotyping of two biparental populations (156 individuals) to identify QTLs associated with spittlebug resistance*

**Santiago Vargas<sup>1</sup>, Paula Espitia<sup>2</sup>, Juan Cardoso<sup>3</sup>, Jeison Velasco<sup>4</sup>, Valheria Castiblanco<sup>5</sup>, Luis Hernández<sup>6</sup>**

esvargast@unal.edu.co<sup>1</sup>, paespitiab@unal.edu.co<sup>2</sup>, j.a.cardoso@cgiar.org<sup>3</sup>,  
jeison.velasco01@uceva.edu.co<sup>4</sup>, v.castiblanco@cgiar.org<sup>5</sup>, l.hernandez@cgiar.org<sup>6</sup>,

### **Summary**

Spittlebugs are the main biotic limitation of *Urochloa* grasses causing great damage in the subtropical and tropical region of America. The Br15b *Urochloa* interspecific hybrid population, its contrasting parents and two resistant testers (CIAT 36087 cv. Mulato II, CIAT 6294 cv. Marandu) were phenotyped to *Aeneolamia varia* nymphs under greenhouse conditions using no-choice tests. Plant damage was measured using a color index obtained by digital image analysis in ImageJ software. This methodology was standardized with the design of a phenobox to reduce the noise in the images, and a macro. Genotypes showed great variability in their response, allowing to establish a tolerance level and, consequently, potential tolerant hybrids with low damage levels. High heritability values were observed in the genetic variability analysis ( $H^2 = 68,8$ ) along with high values of genetic advance.

### **Resumen**

Los salivazos son la principal limitante biótica de los pastos *Urochloa*, causando gran daño en América, donde están distribuidos por la región tropical y subtropical del continente. A través de pruebas de no escogencia, la población de híbridos *Urochloa* interespecífico Br15b, sus parentales contrastantes y dos testigos resistentes (CIAT 36087 cv. Mulato II, CIAT 6294

cv. Marandú) fueron fenotipados al ataque ninfal de *Aeneolamia varia*, bajo condiciones de invernadero. El daño sobre la planta fue medido usando un índice de color mediante el análisis de imágenes digitales en el software Image J. Esta metodología fue estandarizada con el diseño de un phenobox para reducir el ruido de las imágenes, y un macro. Los genotipos mostraron gran variabilidad en su respuesta, permitiendo establecer un nivel de tolerancia y, en consecuencia, híbridos potencialmente tolerantes con bajos niveles de daño. Se observaron valores de heredabilidad alta en el análisis de variabilidad genética ( $H^2 = 68,8$ ).

**Objetivo:** Fenotipar poblaciones biparentales para la identificación de QTLs asociados con la resistencia a salivazo (*Aeneolamia varia* estado ninfal).

## Introducción

Los procesos de fenotipado de alto rendimiento permiten la recopilación de información de rasgos de grandes poblaciones de plantas y el procesamiento de datos, siendo una herramienta importante en el mejoramiento de cultivos y en el fortalecimiento de enfoques de investigación como el mapeo de loci de rasgos cuantitativos, que tienen como objetivo cerrar la brecha genotipo fenotipo mediante la identificación de asociaciones entre rasgos fenotípicos y marcadores genéticos (Czedik-Eysenberg et al., 2018).

Con el fin de identificar esta asociación para la característica de antibiosis y tolerancia al ataque ninfal de *Aeneolamia varia* Fennah (Hemiptera: Cercopidae) dentro del programa de mejoramiento de *Urochloa* interespecífico del CIAT, se construyó una población contrastante para el mapeo de QTLs (Br15b) constituida por cuatro familias de híbridos. Cada familia se obtuvo del cruce entre cuatro parentales sexuales antibióticos producto del décimo ciclo de selección recurrente dentro del programa (Sx 14:0808, Sx 14:0793, Sx 14:0123, Sx 14:1042) y el parental apomítico masculino recurrente y susceptible a salivazo, CIAT 0606 (*U. decumbens* cv. Basilisk). La progenie se clasificó en cuatro familias de 120 híbridos cada una. Este material se propagó desde semilla y se mantuvo en condiciones de invernadero (Fig. 1), podando y fertilizando cada mes para favorecer el crecimiento y macollamiento de los híbridos (Espitia, et al., 2020).



**Figura 1.** Híbridos Br15b mantenidos bajo condiciones de invernadero.

### *Conducción del ensayo de no selección*

Se estableció un ensayo bajo condiciones de invernadero para fenotipar 480 híbridos Br15b, las cuatro madres sexuales, el parental recurrente y control susceptible CIAT 0606 (cv. Basilisk) y dos controles resistentes que fueron CIAT 36087 (cv. Mulato II) y CIAT 6294 (cv. Marandú). Estos genotipos fueron propagados vegetativamente en los invernaderos del CIAT y se establecieron (previa desinfección) en unidades experimentales cilíndricas de 5 cm de diámetro y 6,5 cm de altura, selladas en el extremo inferior por una copa de poliestireno, tapadas con un casquillo de PVC y en las cuales se dispuso aproximadamente 70 g de sustrato (Parsa *et al.*, 2011). Las plantas fueron fertilizadas y regadas para mantener la humedad en el suelo.

El ensayo se estableció bajo un diseño de bloques aumentados de Federer, con múltiples repeticiones completas en el tiempo, donde cada repetición consta de 5 bloques incompletos de 10 x 10; dos tratamientos para todos los genotipos (infestado y no infestado), para un total de mil unidades experimentales (500 infestadas y 500 no infestadas). El presente reporte presenta el análisis de datos correspondiente a la primera repetición en el tiempo. Como variable de respuesta para la clasificación de los genotipos se estableció el porcentaje de daño sobre la planta (relación verde: amarillo).

Las plantas se mantuvieron durante un mes bajo condiciones de invernadero, monitoreando su crecimiento antes de ser infestadas, favoreciendo el desarrollo de raíces superficiales a través de invertir las unidades experimentales durante ocho días antes de la infestación (Fig. 2). Durante este tratamiento se proporcionó una fuente de luz artificial durante las 24 horas del día, de acuerdo con la metodología reportada por Parsa *et al.*, (2011). Seguidamente, se realizó la toma de fotografías inicial, antes de la infestación.

La infestación inició con la selección de huevos maduros de *A. varia* que se obtuvieron de la cría que se estableció en el invernadero de entomología del CIAT, caracterizados por presentar un opérculo bien formado y manchas laterales rojas que corresponden a los ojos y el abdomen. Cada unidad experimental fue infestada con seis huevos maduros de *A. varia*. Esta se verificó a los cinco días, asegurando una infestación homogénea en cada una de las unidades experimentales y se reemplazaron los huevos que no eclosionaron por individuos del insecto en estado ninfal (Espitia, *et al.*, 2020).

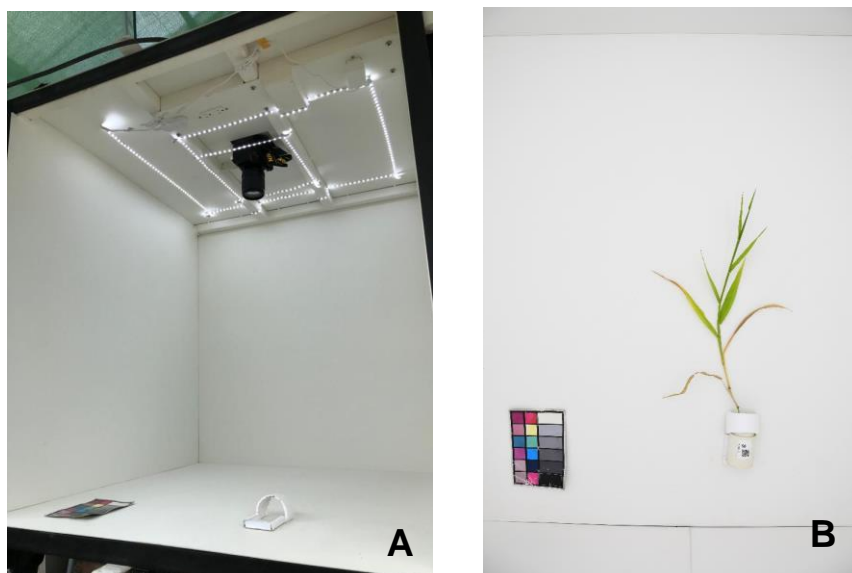


**Figura 2.** Tratamiento para promover el crecimiento de raíces superficiales en las unidades experimentales de *Urochloa* spp. (Espitia, et al., 2020).

Las unidades experimentales se mantuvieron bajo condiciones de invernadero por 35 días. Durante este tiempo se realizó riego inundando las bandejas para no afectar el desarrollo normal de los salivazos. Diariamente se eliminaron inflorescencias y se evitó el escape de los insectos colocando un tapón de espuma en el orificio del casquillo de PVC.

#### *Obtención de imágenes digitales*

Se realizó la toma de fotografías a cada una de las unidades experimentales en el invernadero de entomología de forrajes tropicales. Para ello se estableció una metodología de fenotipado que inició con la construcción de una Phenobox de 1,07 m de largo, 1,12 m de ancho y 1,12 m de alto; equipado con una cinta de luces LED blanca y soporte para la unidad experimental. Allí se ensambló una cámara Nikon D7500 configurada en modo manual, ISO 100, velocidad de obturación de 1/30 s, y apertura de 5.6 (Fig. 3.A). Para la calibración de color se utilizó una escala x-rite PANTONE® colorchecker Passport video. La captura de imágenes se realizó mediante un dispositivo Android conectado de manera inalámbrica a la cámara para evitar su manipulación, como lo indica el protocolo establecido por Espitia, (2020) (Fig. 3.B).



**Figura 3.** Toma de fotografías de las unidades experimentales. A. Cámara Nikon D7500 ensamblada al Phenobox. B. Fotografía de unidad experimental tomada con la configuración de cámara establecida.

#### **Procesamiento de imágenes digitales**

Para cuantificar el porcentaje de daño las imágenes digitales obtenidas se analizaron a través del software Image J.

Las imágenes se sometieron a un procesamiento utilizando el software ImageJ 1.53e (Rasband, 2018), de dominio público desarrollado por National Institutes of Health. El procesamiento se desarrolló en tres etapas (Fig. 4): *i.* Corte de imágenes, seleccionando el área foliar que comprende la unidad experimental (Fig. 4.A). *ii.* Aplicación de un macro de segmentación con el cual se delimita el área de la planta, excluyendo el resto (Fig 4.B). *iii.*

Insertión de LUT (Look Up Table) para dar color a cada píxel de la imagen, a partir de un macro de segmentación (Fig. 4.C).



**Figura 4.** Procesamiento de imágenes utilizando ImageJ. A. Imagen recortada, selección del área de la unidad experimental. B. Aplicación del macro de segmentación. C. Inserción de LUT (Rasband, 2018).

Al finalizar el procesamiento de las imágenes se obtiene el total de píxeles de la parte aérea de la unidad experimental, determinando cuantos de estos fueron verdes (Greenness) y cuantos amarillos (Yellowness). A partir de estos, es posible calcular el porcentaje de área clorótica, síntoma característico del ataque ninfal de *A. varia*, mediante un índice de amarillamiento (Espitia, 2020):

$$\text{Plant damage} = \frac{\text{Yellow pixels}}{\text{Yellow pixels} + \text{Green pixels}} \times 100$$

Este índice se aproxima al porcentaje de daño en las plantas, y a partir de este se realiza el análisis de resultados.

#### *Análisis estadístico*

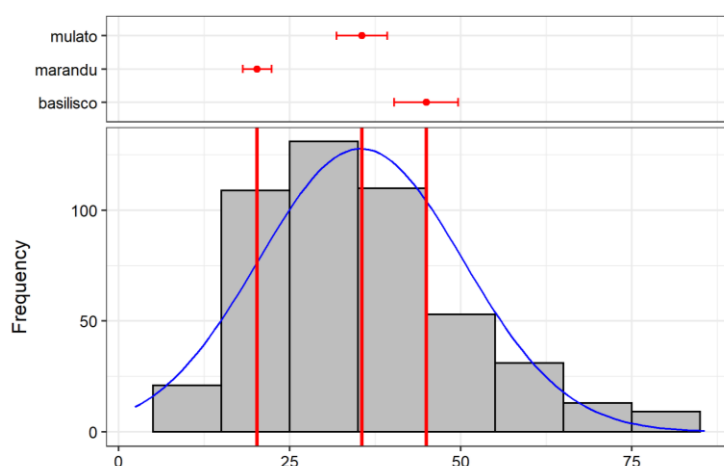
El análisis estadístico se realizó mediante el programa estadístico R (R 4.0.3, R Core Team, 2020). Para determinar diferencias estadísticas se realizó un análisis de varianza y otro de variabilidad genética para la variable porcentaje de daño, utilizando el paquete estadístico *augmentedRCBD* (Aravind *et al.*, 2020).

Los datos de porcentaje de daño presentaron un alto grado de concentración alrededor de la zona central en la distribución de frecuencias, según su coeficiente de curtosis que fue de 3,74 (>3). En general, la evaluación de daño mostró una media ajustada global de 35,37% y un coeficiente de variación de 23,8%; lo que evidencia la homogeneidad de los datos (Fig. 5).

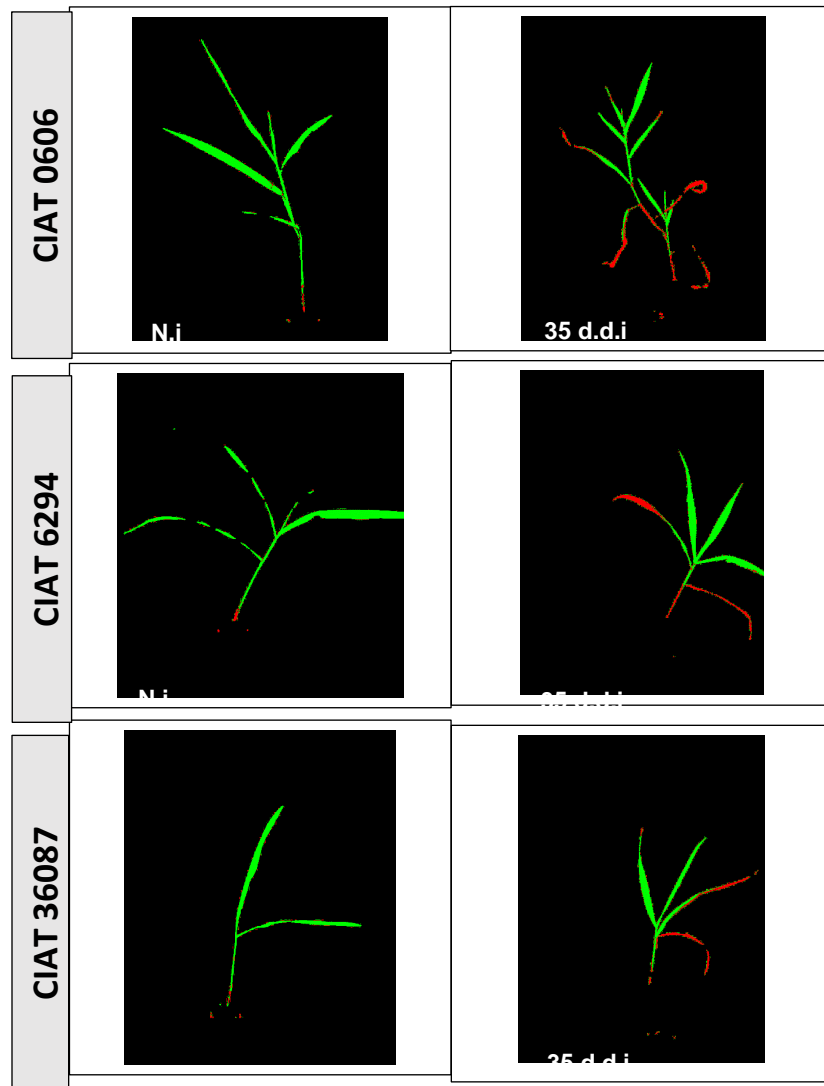
En cuanto a los controles resistentes, en el genotipo Marandú (CIAT 6294), se observó una menor puntuación de daño al ataque ninfal del salivazo de los pastos *A. varia*, pues presentó un porcentaje de daño de 20,2% (Fig. 5); resultado que corrobora lo mencionado por Cardona *et al.*, (2000), quienes lo clasifican como resistente al ataque ninfal ocasionado por *A. varia*

en condiciones de invernadero y de campo. El genotipo Mulato II (CIAT 36087), mostró una puntuación de daño de 35,6% (Fig. 5), valor muy cercano a la media global, mostrando resistencia intermedia según la escala establecida para esta clasificación (Fig. 7). Argel *et al.*, (2007), señalan que en pruebas controladas en invernadero y en observaciones de campo, Mulato II mostró resistencia a diferentes especies de salivazo, incluyendo a *A. varia*. El parental apomíctico Basilisk (CIAT 0606), mostró una puntuación de daño de 44,9% (Fig. 5); clasificándose según la escala (Fig 7), como susceptible; al igual como lo señalan Holmann & Peck, (2002), quienes indican que la susceptibilidad al salivazo de los pastos de este cv. ha reducido su establecimiento y adopción en áreas donde la plaga está presente.

En la figura 6 se relacionan las imágenes digitales procesadas de los testigos, que muestran la cuantificación del porcentaje de daño ocasionado por el ataque ninfal de *A. varia* 35 días después de la infestación, comparada con el procesamiento de imágenes inicial antes de la infestación.



**Figura 5.** Distribución de frecuencia del daño en los genotipos Br15b. (Aravind et al., 2020).



**Figura 6.** Procesamiento digital de imágenes para los controles de resistencia al ataque ninfal de *A. varia*, *U. brizantha* cv. Marandú (CIAT 6294) y *U.* híbrido (CIAT 36087) y el padre susceptible *U. decumbens* cv. Basilisk (CIAT 0606). (N.i: No infestado; D.d.i: días después de la infestación)

Se presentaron diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ ) entre los porcentajes de daño cuantificados en los genotipos Br15b, lo que permitió determinar que existe una alta variabilidad en la respuesta al ataque ninfal de *A. varia* (Tabla 1). Además, no hubo diferencia significativa entre bloques (Tabla 2), es decir, no hay efecto de bloque; lo que hace de esta población un recurso de gran importancia en la construcción de mapas genéticos y el mapeo de loci de rasgos cuantitativos (QTLs).

Por otra parte, los testigos usados en el experimento fueron significativamente diferentes ( $p \leq 0,01$ ) entre ellos (Tabla 1), pero no existió diferencia significativa ( $p \leq 0,05$ ) entre los genotipos Br15b y los testigos evaluados (Tabla 2).

**Tabla 1.** Análisis de varianza (con ajuste de tratamiento) realizado para la variable porcentaje de daño, estimada sobre los genotipos Br15b sembrados en bloques aumentados de Federer bajo condiciones de invernadero.

Source	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
Block (ignoring Treatments)	4	4327.15	1081.79	15.29	0.00081***
Treatment (eliminating Blocks)	478	105134.99	219.95	3.11	0.04*
Treatment: Check	2	1555.51	777.75	10.99	0.01**
Treatment: Test and Test vs. Check	476	103579.48	217.6	3.08	0.04*
Residuals	8	566.01	70.75		

**Tabla 2.** Análisis de varianza (con ajuste de bloques) realizado para la variable porcentaje de daño, estimada sobre los genotipos Br15b sembrados en bloques aumentados de Federer bajo condiciones de invernadero.

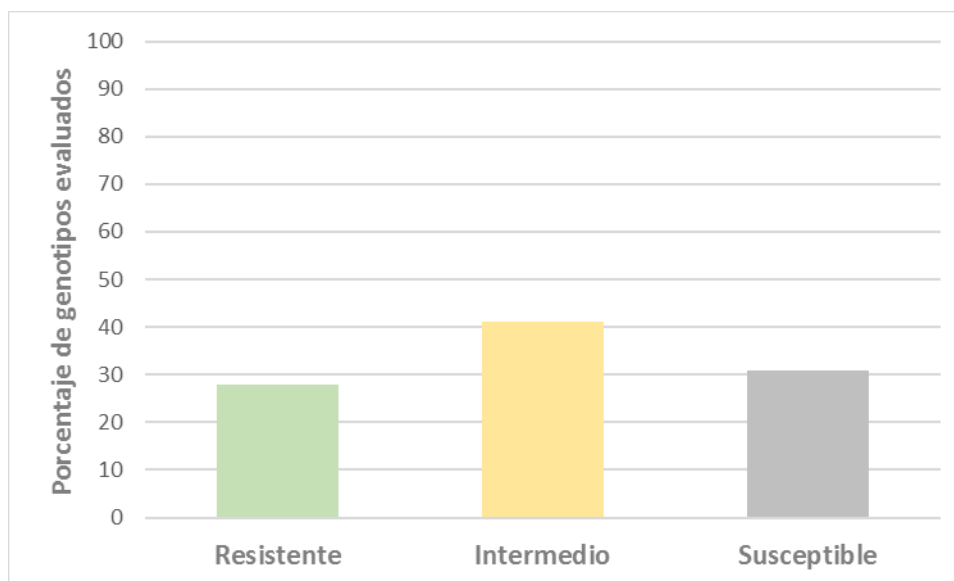
Source	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
Treatment (ignoring Blocks)	478	109232.99	228.52	3.23	0.04*
Treatment: Check	2	1555.51	777.75	10.99	0.01**
Treatment: Test	475	107631.95	226.59	3.2	0.04*
Treatment: Test vs. Check	1	45.53	45.53	0.64	0.45
Block (eliminating Treatments)	4	229.15	57.29	0.81	0.55
Residuals	8	566.01	70.75		

Las puntuaciones de porcentaje de daño variaron entre 2,4% (Br15b:0361) y 85,7% (Br15b:0384). Los genotipos Br15b:0361, Br15b:0283, Br15b:0292, Br15b:2203 y Br15b:0351, mostraron porcentajes de daño bajos (2,37%, 6,71%, 8,8%, 8,9%, y 9,1% respectivamente).

En este experimento, se identificaron varios genotipos de *Urochloa* interespecífico con un nivel considerable de tolerancia al daño ninfal ocasionado por *A. varia*, de acuerdo con tres niveles de resistencia: < 25%, resistente; 25,1-40%, intermedio; > 40%, susceptible; lo que



permitió establecer que el 28% (131) de los genotipos evaluados son resistentes, el 41% (197) presenta resistencia intermedia y el 31% (151) muestra susceptibilidad (Fig. 7).



**Figura 7.** Clasificación de los genotipos evaluados al ataque ninfal de *A. varia* basada en el porcentaje de daño sobre la planta (< 25%, resistente; 25,1-40%, intermedio; > 40%, susceptible).

#### *Análisis de variabilidad genética*

Los resultados del análisis de variabilidad genética (tabla 3), muestran una alta magnitud de la variación fenotípica (PV), que está constituida por una alta variación genotípica (GV) y una menor variación ambiental (EV). Esto significa que existe alta variabilidad genética para la variable porcentaje de daño en los genotipos Br15b que no es influenciada por el entorno.

**Tabla 3:** Análisis de variabilidad genética a partir de los datos de porcentaje de daño obtenidos en la población Br15b evaluada bajo condiciones de invernadero.

Statistic	Mean	PV	GV	EV	GCV	GCV category	PCV	PCV category	ECV	hBS	hBS category	GA	GAM	GAM category
Value	35.37	226.59	155.84	70.75	35.29	High	42.55	High	23.78	68.78	High	21.36	60.38	High

**PV:** Variación fenotípica; **GV:** Variación genotípica; **EV:** Variación ambiental; **GCV:** Coeficiente de variación genotípica; **PCV:** Coeficiente de variación fenotípica; **ECV:** Coeficiente de variación ambiental; **hBS:** Heredabilidad en sentido amplio; **GA:** Avance genético; **GAM:** Avance genético como porcentaje de la media.

La heredabilidad del valor fenotípico evaluado se clasificó como alta, lo que plantea que una selección de genotipos basada en el porcentaje de daño generado por *A. varia* puede ser efectiva; pues una heredabilidad alta sugiere que es una característica poco influenciada por el ambiente (Hernández *et al.*, 2019), además de ser una medida indirecta de la exactitud del experimento.

Finalmente, los resultados de este ensayo resaltan una amplia variación en los niveles de resistencia a *Aeneolamia varia*; y a partir de esta, surgen genotipos candidatos potencialmente útiles como Br15b:0361, Br15b:0283, Br15b:0292, Br15b:2203 y Br15b:0351, que presentaron porcentajes de daño bajos y que pueden ser usados en zonas donde la plaga está presente.

## Perspectivas

1. Realizar mediciones en el tiempo para obtener datos fenotípicos mediante la evaluación de la población de Br15b para el ataque ninfal de *Aeneolamia varia*.
2. Comparar la resistencia dentro y entre familias en estudio.
3. Relacionar los datos fenotípicos con los datos de secuenciación y así, identificar QTLs para resistencia a *A. varia* en estado de ninfa.

## Referencias

- Aravind, J., Mukesh Sankar, S Wankhede, D. P., & Kaur, V. (2020). *augmentedRCBD: Analysis of Augmented Randomised Complete Block Designs*. (R package version 0.1.3.9000).
- Argel, P. J., Miles, J. W., Guiot, J. D., Cuadrado, H., & Lascano, C. E. (2007). Cultivar Mulato II (*Brachiaria* Híbrido CIAT 36087). *CIAT*, 22.
- Cardona, C., Sotelo, G., & Miles, J. (2000). Avances en Investigación sobre Resistencia de *Brachiaria* a Salivazo. *CIAT*, 2, 8.
- Czedik-Eysenberg, A., Seitner, S., Güldener, U., Koemeda, S., Jez, J., Colombini, M., & Djamei, A. (2018). The ‘PhenoBox’, a flexible, automated, open-source plant phenotyping solution. *New Phytologist*, 219(2), 808–823. <https://doi.org/10.1111/nph.15129>
- Espitia, P. (2020). Fenotipificación a través de imágenes digitales. En *Alliance of Bioversity and CIAT* (Número 1, p. 29).
- Espitia, P., Hernández, L. M., Velasco, J., & Castiblanco, V. (2020). Report on evaluation of promising *Brachiaria* hybrid populations for resistance against spittlebug. En *Alliance of Bioversity and CIAT*. <https://cgspace.cgiar.org/handle/10568/111236>
- Espitia, P., Mazabel, J., & Hernández, L. M. (2020a). *Protocolo de cría de Cercópodos: Manejo* (p. 14). Alliance of Bioversity and CIAT.
- Espitia, P., Mazabel, J., & Hernández, L. M. (2020b). *Protocolo de cría de Cercópodos: Establecimiento* (p. 8). Alliance of Bioversity and CIAT.
- Hernández, L. M., Espitia, P., Castiblanco, V., & Rios, G. (2019). Report on selections and hybrid performance in first multienviromental trial (Observation 1) of Br19. En *Alliance of Bioversity and CIAT*.
- Holmann, F., & Peck, D. C. (2002). Economic damage caused by spittlebugs (Homoptera: Cercopidae) in Colombia: A first approximation of impact on animal production in *Brachiaria decumbens* pastures. *Neotropical Entomology*, 31(2), 275–284.

<https://doi.org/10.1590/s1519-566x2002000200016>

Parsa, S., Sotelo, G., & Cardona, C. (2011). Characterizing herbivore resistance mechanisms: Spittlebugs on *Brachiaria* spp. as an example. *Journal of Visualized Experiments*, 52, 2–5. <https://doi.org/10.3791/3047>

R Core Team. (2020). *R: A language and environment for statistical computing*. R Foundation for Statistical Computing. <https://www.r-project.org/>

Rasband, W. (2018). *ImageJ* (1.53e). National Institutes of Health.